

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-288105

(43)Date of publication of application : 16.10.2001

(51)Int.Cl.

A61K 38/00

A23L 1/305

A61K 7/16

A61K 48/00

A61P 1/02

A61P 29/00

A61P 31/04

C12N 15/09

// C07K 14/47

C12P 21/02

BEST AVAILABLE COPY

(21)Application number : 2000-103906

(71)Applicant : ABIKO YOSHIHIRO
KAKU TORU
ARAKAWA TOSHIYA
TAKUMA YASUNOBU

(22)Date of filing : 05.04.2000

(72)Inventor : ABIKO YOSHIHIRO
KAKU TORU
NISHIMURA SATOKO
ARAKAWA TOSHIYA
TAKUMA YASUNOBU
NAKAJIMA KEISUKE
KOWASHI YUTEN
MIZOGUCHI ITARU

(54) MEDICINE FOR PERIODONTITIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a prophylactic and a therapeutic agents for periodontitis safe for human bodies.

SOLUTION: This medicine for the periodontitis comprises human β -defensin 1 or human β -defensin 2 or both which are safe human antimicrobial peptides produced by humans and is used to carry out the prophylaxis and treatment of the periodontitis. Furthermore, a vector comprising genes of the human β -defensin 1 and human β -defensin 2 transduced thereinto is used to express the human β -defensin 1 and/or human β -defensin 2 in the oral cavity and suppress the proliferation of causative bacteria of the periodontitis.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.11.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

AP

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-288105

(P2001-288105A)

(43) 公開日 平成13年10月16日 (2001. 10. 16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 K 38/00		A 2 3 L 1/305	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/305		A 6 1 K 7/16	4 B 0 2 4
A 6 1 K 7/16		48/00	4 B 0 6 4
48/00		A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 3
A 6 1 P 1/02		29/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-103906(P2000-103906)

(22) 出願日 平成12年4月5日(2000. 4. 5)

(71) 出願人 500159037
安彦 善裕
札幌市北区拓北7条3丁目9-12メイユール7. 3-101

(71) 出願人 500158993
賀来 亨
札幌市西区山の手1条8丁目3-25-301

(71) 出願人 500159004
荒川 俊哉
札幌市北区百合ヶ原5丁目6番12号ロイヤルパーク101

(74) 代理人 100108327
弁理士 石井 良和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯周炎用医薬

(57) 【要約】

【課題】人体に安全な歯周炎予防及び治療薬を提供する。

【解決手段】 ヒトが産生する安全なヒト抗菌ペプチドのヒトβディフェンシン1及び/またはヒトβディフェンシン2を用いて歯周炎を予防及び治療する。さらに、ヒトβディフェンシン1及びヒトβディフェンシン2の遺伝子を導入したベクターを用い、口腔内においてヒトβディフェンシン1及び/またはヒトβディフェンシン2を発現させ、歯周炎原因菌の増殖を抑制する。

AP

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト抗菌ペプチドであるヒト β ディフェンシン1及び またはヒト β ディフェンシン2を有効成分とする歯周炎用医薬。

【請求項2】ヒト抗菌ペプチドであるヒト β ディフェンシン1及び/またはヒト β ディフェンシン2を含有する飲食品。

【請求項3】ヒト抗菌ペプチドであるヒト β ディフェンシン1及び/またはヒト β ディフェンシン2を含有する歯磨剤

【請求項4】ヒト β ディフェンシン1またはヒト β ディフェンシン2のいずれかの遺伝子を導入したベクター。

【請求項5】ヒト β ディフェンシン1またはヒト β ディフェンシン2のいずれかの遺伝子を導入したベクターを含む歯周炎用医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、人体に安全な抗菌ペプチドを利用した歯周炎予防及び治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明の課題】歯周炎は現代病であり、多くの人の悩みである。歯周炎はグラム陰性菌による感染症であることが判明しており、薬品によって病原菌を押さえ込むことが試みられている。従来、クロルヘキシジンなどの合成抗菌剤や合成セファロスポリン系やテトラサイクリン系などの抗生物質が使われてきた。しかし、合成抗菌剤や抗生物質を長期間使用することは、安全性の点や口腔内衛生を保持するのに必要な常在菌までも殺すことになるなどの点で好ましくない。

【0003】また、最近薬剤やブラッシングによる歯周ポケットのコントロールだけでは治療するのがむずかしい若年性歯周炎が問題となっているが、原因が特定できず、決め手になる治療薬がなかった。

【0004】そこで、ヒトが生体内で産生している安全なヒト抗菌ペプチドを利用して歯周炎原因菌を抑制すること、又、若年性歯周炎に効果のある医薬を提供することが本発明の目的である。

【0005】

【課題の解決手段】ヒト抗菌ペプチドのなかでも、ヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2が歯周炎原因菌の抑制に有効であることを見いだした。ヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2が、歯周炎の原因菌の1つであるグラム陰性菌の*Actinobacillus actinomycesetemcomitans* (AA菌)に強い抗菌活性があることを確認した。また、*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium species*, *Eubacter*

ium species, *Treponema species*などの歯周炎原因菌にも抗菌活性があった。

【0006】歯周炎予防及び治療薬は、ヒト β ディフェンシン1またはヒト β ディフェンシン2を有効成分とするものであり、例えば、飴、ガム、トローチ、歯磨剤、洗口剤、口腔用軟膏、外用液剤等の形態で飲食品及び医薬に配合して用いることができる。ヒト β ディフェンシン1またはヒト β ディフェンシン2は、生体成分であって適切な用法の下では人体に危害を及ぼすことがなく、安全なものであり、飲食品等に添加してもそれらの臭味に影響を与えるものでない。

【0007】さらに、AA菌が深く関わっている遺伝性の若年性歯周炎に対しては、ヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2遺伝子を発現ベクターに組み込み、KB細胞等の口腔上皮由来の細胞に導入したところ、ヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2遺伝子が発現することを見いだした。従って、ヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2遺伝子をウィルスベクターに組み込んだ後、ウィルスに導入し、適宜の手段でこれを歯肉上皮に塗布してウィルスを歯肉上皮に感染させ、ヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2を発現させることが可能である。

【0008】

【実施例】

【実施例1】歯周炎の原因菌の1つである*Actinobacillus actinomycesetemcomitans* (AA菌) 1×10^7 個を160 μ lのPBS (-)に分散させたものを2本作り、1本にヒト β ディフェンシン2 (0.85 μ g/ μ l)を40 μ l加え全量を200 μ lとする(最終濃度は0.17 μ g/ μ l、40 μ Mとなる)。

【0009】もう一本はコントロールとして40 μ lのPBS (-)を加え、両方を室温で30分インキュベートした。その後800 μ lのTodd Hewith Broth (培養液)を加え、100 μ lづつ96穴の培養ディッシュにまいて培養した。各時間ごとの吸光度 (OD550nm)を測定し、菌の数を同定した。その結果を図1に示す。図1より明らかなように時間の経過とともにヒト β ディフェンシン2がAA菌の増加を抑制した。ヒト β ディフェンシン1についても同様の操作をおこなったところ、同様の結果が得られた。

【0010】ヒト β ディフェンシン1またはヒト β ディフェンシン2を含有する配合1及び配合2に示すクリームを調整し、歯周炎患者に適用した。

配合1

グリセリン	85.00 (重量%)
ヒト β ディフェンシン2	0.01
キシタンガム	4.00
塩化ナトリウム	0.49
蒸留水	10.50

【0011】配合2

グリセリン	85.00 (重量%)
ヒトβディフェンシン1	0.01
ヒトβディフェンシン2	0.01
キサントガム	4.00
塩化ナトリウム	0.48
蒸留水	10.50

【0012】このクリームを、歯周炎初期の口臭が感じられ、歯肉が赤く腫れている10人に指で塗布しマッサージさせたところ、3ヶ月後に7人は歯肉がピンク色になり、口臭が感じられなくなった。2人は、歯肉がピンク色になり腫れはなくなったが、僅かに口臭が感じられた。1人は歯肉の赤みが多少残り、口臭は適用初期よりは改善されたが多少感じられた。

【0013】

【実施例2】ヒトβディフェンシン2をRT-PCR法によってSCC-9細胞（口腔癌の細胞）より単離し、GFPを持つ発現ベクター（pEGFP-N1、商品名）に組み込んだ。（図2参照）。これをKB細胞に遺伝子導入し、その発現をGFPの蛍光及びローダミン標識の抗ディフェンシン2抗体によって染色し確認した。

（図3写真参照）

【0014】ヒトβディフェンシン2の遺伝子配列は以下の通りである。

atgagggtcttgtatctcctcttct
cgttcctcttcatattcctgatgcc
tcttccagggtgttttttggtggata
ggcgatcctgttacctgcccttaaga
gtggagccatatgtcatccagtctt
ttgccctagaagggtataaacaatt
ggcacctgtggtctccttggaacaa
aatgctgcaaaaagccatga

【0015】このヒトβディフェンシン2を導入したKB細胞よりRNAを抽出し、ヒトβディフェンシン2のmRNAの発現量を定量的PCR法によって定量した

（図4参照）。さらに、同様にKB細胞より蛋白質を抽出し、Western blot法によってヒトβディフェンシン2の蛋白レベルでの発現を確認した。さらにヒトβディフェンシン2を遺伝子導入したKB細胞にAA菌を感染させKB細胞のアポトーシス（細胞死）を観察した。その結果を図5に示す。図5に示されるように、ヒトβディフェンシン2の遺伝子を導入した方がアポトーシスが起これにくいことが判明した。また、ヒトβディフェンシン1についても同様の操作をおこなったところ同様の結果が得られた。

【0016】ヒトβディフェンシン1の遺伝子配列は以下の通りである。

atgagaacttctaccttctgctgt
ttactctctgcttacttttgtctga
gatggcctcagggtggttaactttctc

acaggccttgggcacagatctgac
attacaattgcgtcagcagtgagg
gcaatgtctctattctgcctgccc
atctttaccaaaattcaaggcacct
gttacagagggaaggccaagtgtg
caagtga

【0017】ヒトβディフェンシン1、または、ヒトβディフェンシン2の遺伝子をウィルスベクターに組み込み、アデノウィルスに導入し、このウィルスを実施例1と同じクリーム100gあたり0.2gを添加した。このクリームを注射針で、人工的に歯周炎を起こした大5匹の歯周ポケットに適用したところ、1ヶ月で歯肉の腫れが消退し、さらに、1年以上経過しても歯肉の腫れが認められなかった。

【0018】

【実施例3】ヒトβディフェンシン2は歯周炎の原因菌のAA菌に効果があることが確認されたので、常法に従って、ガム、飴、トローチ、歯磨剤、洗口剤、口腔用軟膏剤または局所消毒剤とすることができた。また、ヒトβディフェンシン1についても同様に食品や口腔用軟膏剤に添加することが可能である。

【0019】歯周炎予防及び治療用歯磨剤の製造

表1に示す配合で各成分を混合し、クリーム状の歯周炎予防及び治療用歯磨剤を製造した。

【0020】表1

グリセリン	70.00 (重量%)
ヒトβディフェンシン2	0.01
フッ化ナトリウム	0.30
キサントガム	1.00
塩化ナトリウム	0.49
二酸化ケイ素	20.00
ミントフレーバー	1.00
二酸化チタン	0.70
蒸留水	6.50

【0021】この歯磨剤を蓋付き容器で3ヶ月間保存したところ、外観上はなんの変化もみられなかった。この歯磨剤を利用して、歯周炎初期の口臭が感じられる人10人に毎食後3分間のブラッシングを3ヶ月間励行させたところ、全員の歯肉の腫れが消退し、口臭がなくなった。

【0022】

【発明の効果】本発明のヒトβディフェンシン1及び/またはヒトβディフェンシン2を有効成分とする歯周炎予防及び治療薬は、歯周炎の原因菌であるAA菌の減少を抑えることができ、歯周炎の予防及び治療に有効である。また、本発明の歯周炎予防及び治療薬は、例えばガム、飴、トローチ、歯磨剤、洗口剤、口腔用軟膏剤または局所消毒剤等の形態で飲食品及び医薬に配合することによって大きな予防及び治療効果が得られる。さらに、ヒトβディフェンシン1及びヒトβディフェンシン2の

遺伝子を導入したベクターは、口腔の上皮細胞においてヒト β ディフェンシン1及びヒト β ディフェンシン2を発現させるので、若年性歯周炎に対しても効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】AA菌の増殖抑制効果を示すグラフ。

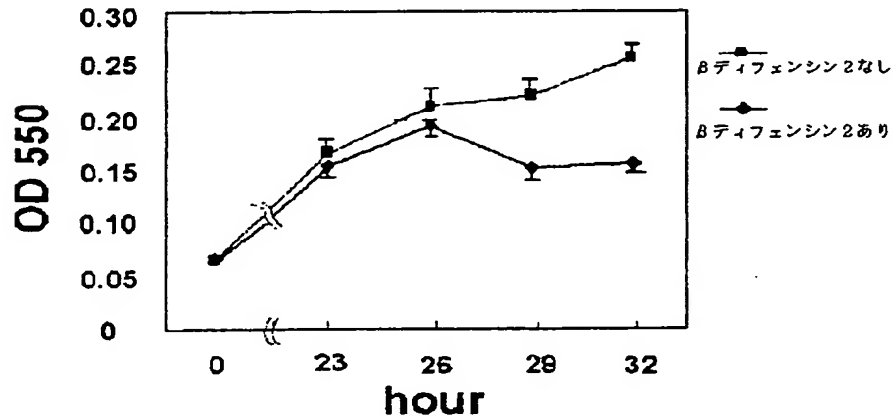
【図2】発現ベクターの説明図。

【図3】ヒト β ディフェンシン蛋白の発現状態を確認した写真。

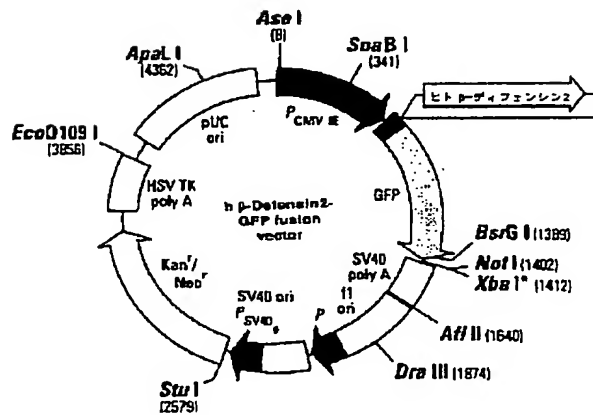
【図4】KB細胞のディフェンシンmRNA量を示すグラフ。

【図5】ベクターを導入したKB細胞のAA菌に対する作用を示すグラフ。

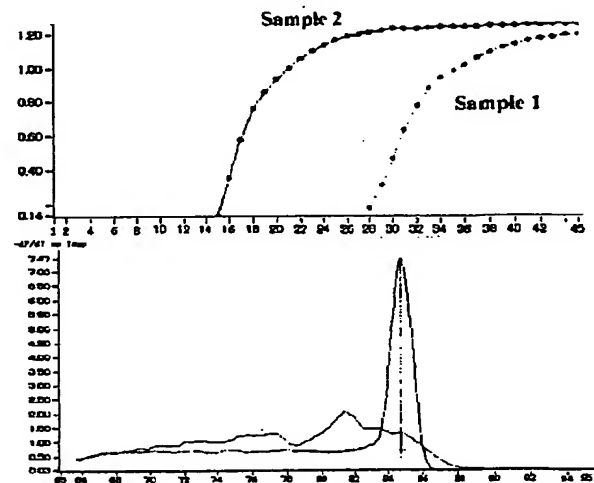
【図1】



【図2】



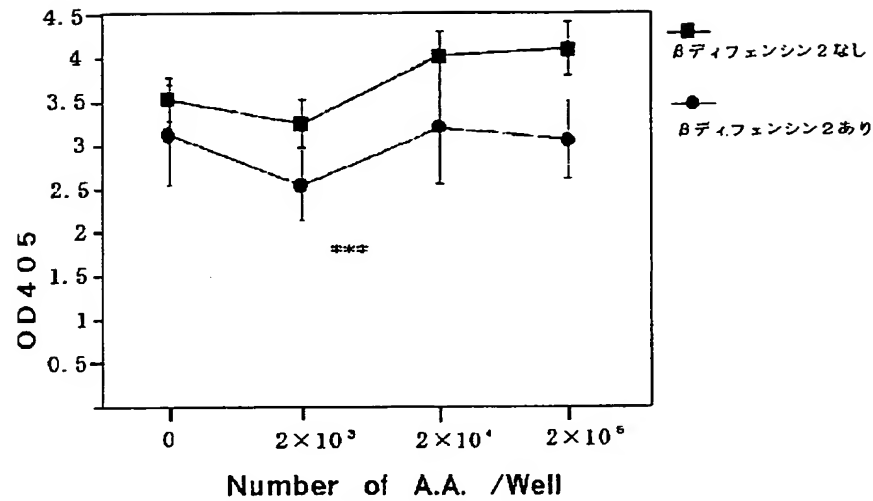
【図4】



【図3】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成12年11月9日(2000. 11. 9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】削除

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】削除

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

A61P 29/00

31/04

C12N 15/09

// C07K 14/47

C12P 21/02

識別記号

ZNA

FI

A61P 31/04

C07K 14/47

C12P 21/02

A61K 37/02

C12N 15/00

テーマコード(参考)

4H045

C

ZNAA

札幌市北区あいの里3条9丁目14-6

EA29 FA72 FA74 HA04

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.